

COMUNICADO
TÉCNICO

257

Fortaleza, CE
Setembro, 2019

Embrapa

Metodologia Baseada em Extração em Fase Sólida (EFS) como Parte da Estratégia de Desreplicação para Prospeção de Moléculas com Atividade Citotóxica em *Phyllanthus* spp.

Maria Francilene Souza Silva
Francisca Aliny Nunes Silva
Adriana Dutra Sousa
Lorena Mara Alexandre e Silva
Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro
Kirley Marques Canuto
Edy Sousa de Brito
Claudia do Ó Pessoa
Guilherme Julião Zocolo

Metodologia Baseada em Extração em Fase Sólida (EFS) como Parte da Estratégia de Desreplicação para Prospeção de Moléculas com Atividade Citotóxica em *Phyllanthus* spp.¹

¹ Maria Francilene Souza Silva, graduação em Ciências Biológicas, doutora em Biotecnologia-RENORBIO, Fortaleza, CE; Francisca Aliny Nunes Silva, bacharel em Química com habilitação industrial, bolsista, Fortaleza, CE; Adriana Dutra Sousa, engenheira de alimentos, doutora em Engenharia Química-UFC, Fortaleza, CE; Lorena Mara Alexandre e Silva, química tecnológica, analista do Laboratório de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro, bacharel em Química Industrial, analista do Laboratório de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Kirley Marques Canuto, farmacêutico, doutor em Química de Produtos Naturais, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Edy Sousa de Brito, químico industrial, doutor em Tecnologia de Alimentos, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE; Claudia do Ó Pessoa, bacharel em Farmácia Bioquímica, doutora em Farmacologia, professora associada IV-UFC e pesquisadora associada FIOCRUZ-CE, Fortaleza, CE; Guilherme Julião Zocolo, bacharel em química, doutor em Química Analítica, pesquisador da Embrapa Agroindústria Tropical, Fortaleza, CE

As espécies do gênero *Phyllanthus* L. pertencem à família Phyllanthaceae. No Brasil, são registradas 89 espécies e 10 subespécies ocorrendo na Amazônia, na Caatinga, no Cerrado, na Mata Atlântica, no Pampa e no Pantanal (Secco et al., 2016). São plantas conhecidas popularmente como quebra-pedra e amplamente usadas na medicina popular brasileira no tratamento de cálculos renais (Unander et al., 1992).

Extratos de espécies de *Phyllanthus* têm mostrado potencial terapêutico em muitos estudos clínicos, alguns com propriedades bastante estabelecidas, incluindo anti-hepatotóxico, antilítico,

anti-hipertensivo, anti-HIV, anti-hepatite B e, mais recentemente, anticancerígeno (Patel et al., 2011). Segundo Newman e Cragg (2007), o impacto dos produtos naturais é maior quando se trata de medicamentos que são indicados para doenças graves ou potencialmente fatais, tais como câncer e doenças infecciosas. Dentre as drogas anticâncer, 47% são produtos naturais ou de derivados semissintéticos.

A desreplicação (*dereplication*: “não replicar”) vem sendo considerada uma etapa crucial no processo de triagem de extratos a fim de evitar o isolamento e a determinação estrutural de substâncias

já conhecidas por meio dos métodos convencionais (Beutler et al., 1990). A química dos produtos naturais vem abordando a desreplicação, baseada na disponibilidade de métodos de triagem/instrumentação, tempo e custo de identificação das possíveis derivações biológicas ou novos compostos a partir de um extrato bruto (Dias; Urban; Roessner, 2012).

Dentre as técnicas de extração utilizadas para concentrar analitos, tem-se a extração de fase sólida (EFS), em que os analitos contidos numa matriz aquosa são separados dos compostos interferentes após passarem por um cartucho contendo solvente (Barrionuevo, 2001). Portanto, o presente comunicado descreve o preparo de extratos e etapas de extração em fase sólida de amostras de quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* e *P. niruri*), bem como demonstra o potencial citotóxico in vitro das amostras pré-fracionadas em linhagens de células tumorais.

Descrição do protocolo

Coleta e preparo das amostras para extração

Folhas e frutos de *Phyllanthus amarus* e *Phyllanthus niruri* foram secas em estufa de circulação de ar, em temperatura de 40 °C, durante 48

horas e moídas em moinho de facas tipo WILLEY (Fortinox), modelo BT 602. O material foi mantido em temperatura ambiente até o início das extrações.

Extração acelerada por solvente (ASE)

As extrações foram realizadas em um sistema Dionex, ASE 350™, utilizando-se água deionizada como solvente. Foram pesados 15 g de planta seca e misturados com terra diatomácea (agente dispersante), em seguida colocou-se em células de aço inox de 66 mL. As células foram equipadas com um filtro de aço inox e um filtro de celulose na parte inferior para evitar a presença de partículas em suspensão no frasco de coleta. As extrações foram realizadas em temperatura de 80 °C, em três ciclos de 5 minutos e pressão de 1600±100 psi. Os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo com vácuo, em temperatura de 40 °C, e depois congelados e liofilizados.

Pré-fracionamento – Extração em fase sólida (EFS)

A regra dos cinco (RO5 do inglês: *rule of five*) é uma regra prática para avaliar a toxicodependência ou determinar se um composto químico com uma certa atividade farmacológica ou biológica possui propriedades que o tornariam

um provável fármaco oralmente ativo em humanos (Lipinski, 2004), baseada na observação de que a maioria dos medicamentos são moléculas relativamente pequenas e hidrofílicas.

A extração em fase sólida é realizada utilizando-se adsorventes com diferentes superfícies químicas para eliminação de componentes com $\log P > 5$ (CAMP et al., 2011). Compostos com $\log P < 5$ são mais susceptíveis de serem permeáveis em membranas e mais facilmente absorvíveis pelo corpo, sendo, portanto, substâncias com maior probabilidade de se tornarem candidatos a potenciais fármacos (Lipinski et al., 1997).

Desse modo, testaram-se três tipos de adsorventes: C18 (Agilent Bond Elut-C18-bonded sílica), OASIS (Oasis HLB Cartridge - polimérico, Waters) e Plexa (polimérico). A quantidade adsorvente e o volume usado para o cartucho Bond Elut C18 é 500 mg/10 mL, Plexa – 500 mg/12 mL e para o cartucho OASIS – 60 mg/3 mL. Foram avaliados quatro tipos de solventes de eluição: MeOH/H₂O 70:30; MeOH/H₂O 80:20; MeOH/H₂O 70:30 + á.f. (ácido fórmico); e MeOH/H₂O 80:20 + á.f.

Foram solubilizados 25 mg de extrato bruto em 10 mL de H₂O Milli-Q por 10 min em ultrassom, a uma frequência de 40 kHz e com 150 W de potência, para extração nos adsorventes C18

e Plexa. Para o adsorvente OASIS, foram pesados 10 mg de extrato bruto, considerando-se sua capacidade de retenção de 3 a 5 vezes maior do que os outros cartuchos de SPE. Foram adicionados 5 mL de H₂O Milli-Q e ultrassom por 3 min. As massas usadas foram baseadas na relação geral 20:1 massa adsorvente do cartucho/massa da amostra.

Para o pré-fracionamento EFS, utilizou-se o manifold com um fluxo de aproximadamente 1 mL/min. O uso de cada adsorvente foi precedido de acondicionamento com 3 mL de MeOH grau HPLC, equilibrado com 3 mL de H₂O Milli-Q e aplicou-se a amostra do extrato, sendo transferida aos poucos para o adsorvente; em seguida, realizou-se a limpeza da amostra com 3 mL de H₂O Milli-Q e eluição com 5 mL do solvente (eluente: MeOH/H₂O 70:30, 80:20, 70:30 + á.f. e 80:20 + á.f.). O eluato foi coletado em tubos de ensaio e depois transferido para o frasco de penicilina etiquetado e tarado de acordo com o tratamento de EFS recebido.

O cartucho OASIS foi acondicionado com 3 mL de MeOH grau HPLC, equilibrado com 3 mL de H₂O Milli-Q, aplicou-se a amostra no cartucho e realizou-se a limpeza da amostra com 1,5 mL de H₂O Milli-Q, seguida da eluição com 3 mL de MeOH/H₂O 70:30. Deve-se tomar o cuidado para que os adsorventes não sequem.

As amostras foram rotaevaporadas com pressão inicial de 190 mbar e final em torno de 100 mbar, banho de 40 °C em 25 rpm até todo o MeOH ser evaporado. Em seguida, os frascos com as amostras liofilizadas foram direcionados para posteriores testes biológicos, análises por espectrometria

de massas e ressonância magnética nuclear (RMN). Os experimentos foram realizados em triplicatas, o adsorvente C18 foi utilizado para todos os solventes de eluição, já o OASIS e o Plexa foram utilizados apenas para o solvente MeOH/H₂O 70:30. O esquema geral pode ser observado na Figura 1.

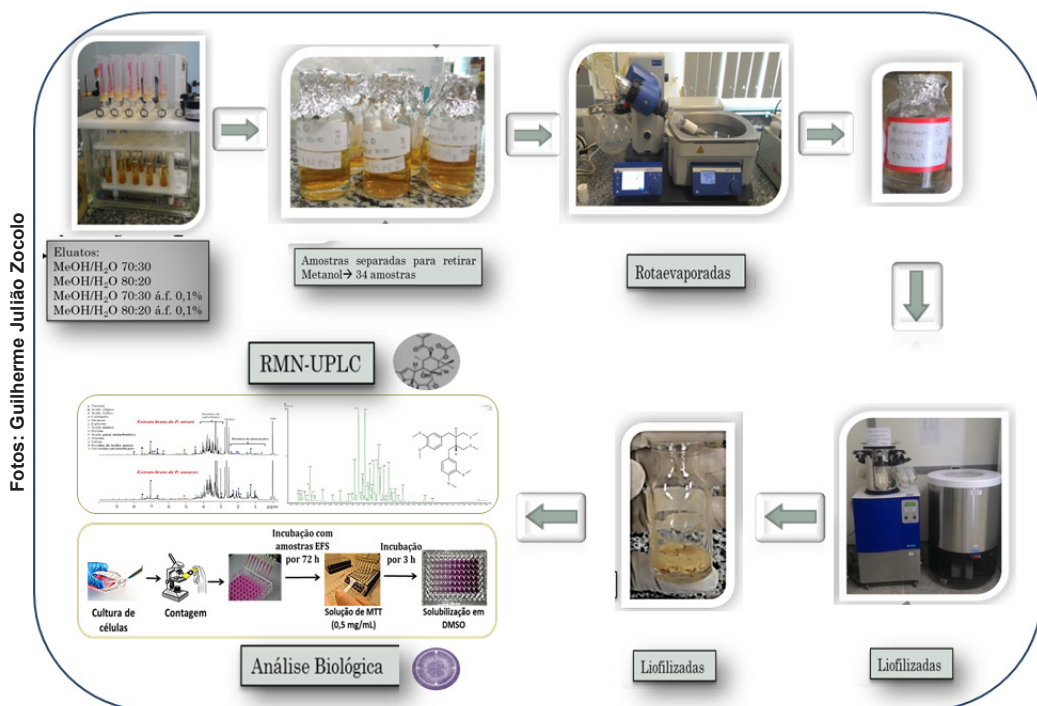


Figura 1. Etapas de preparo de amostras baseado na extração em fase sólida (EFS), com subsequentes avaliações químicas e biológicas.

Ensaio citotóxico

As amostras pré-fracionadas foram testadas em quatro linhagens de células tumorais: HCT-116 (côlon humano), PC3 (câncer de próstata), HL60 (leucemia

promielocítica) e SF-295 (glioblastoma) cedidas pelo Instituto Nacional do Câncer (EUA), tendo sido cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos,

mantidas em estufa a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. Para o teste de concentração única, as mostras foram testadas na concentração de 50 µg/mL. Para alcançar essa concentração, as amostras foram solubilizadas em água Milli-Q. Na avaliação de citotoxicidade, utilizou-se o método MTT (Skehan et al., 1990).

Ao avaliar as amostras testadas nos quatro tipos de solventes de eluição e em três cartuchos adsorventes, percebeu-se que os três cartuchos apresentaram um rendimento em massa satisfatório, havendo perda de massa associada a substâncias de baixa polaridade e alta polaridade para as duas espécies de *Phyllanthus* spp.

Nas análises de testes de concentração única, as amostras do extrato bruto não apresentaram citotoxicidade frente às linhagens tumorais testadas. Porém, após remoção de interferentes através da EFS, 12 amostras apresentaram potencial citotóxico acima de 30%, sendo nove na linhagem SF295. Em PC3 apenas uma apresentou 31% de citotoxicidade, e na linhagem HCT116 duas amostras apresentaram potenciais acima de 30%. Segundo Lanças (2004), deve haver a remoção de interferentes para que não haja falso positivo, sendo demonstrado no presente estudo que a perda de massa é considerada ganho, pois houve aumento da atividade citotóxica das amostras após passagem pelos adsorventes.

Após análise de concentração única das frações, fez-se a curva para verificar a concentração inibitória média (CI₅₀), em que os melhores resultados foram evidenciados para as amostras de *P. niruri* MeOH/H₂O 70:30 e adsorvente C18 com CI₅₀ 50,25 µg/mL na linhagem HCT-116 (cólon humano). Os resultados do presente estudo demonstram melhores resultados de CI₅₀ em relação aos reportados por Tang et al. (2010), que variou de 150-300 µg/mL em linhagem prostática.

Os cartuchos poliméricos apresentaram bons fatores de retenção, tendo atividade citotóxica do material fracionado com menor intensidade se comparados ao C18. Tendo em vista os adsorventes e eluentes, os melhores resultados foram obtidos para o cartucho C18, utilizando-se o eluente MeOH/H₂O 70:30, no qual nove amostras apresentaram potencial citotóxico acima de 30%.

A extração em fase sólida possibilita a concentração de moléculas com características físico-químicas desejáveis para estudos de alvos celulares investigados por citotoxicidade. Esse sistema fornece amostras com reduzidas quantidades de interferentes, que mascaram os resultados de análises biológicas, e consequentemente aumenta a probabilidade de sucesso na busca de moléculas potencialmente ativas.

Referências

- BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (spe) e micro extração em fase sólida (spme) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.
- BEUTLER, J. A.; ALVARADO, A. B.; SCHAUFELBERGER, D. E.; ANDREWS, P.; MCCLOUD, T. G. Dereplication of phorbol bioactives: *Lyngbya majuscula* and *Croton cuneatus*. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 4, p. 867-74, 1990.
- CAMP, D.; DAVIS, R. A.; CAMPITELLI, M.; EBDON, J.; QUINN, R. J. Drug-like properties: guiding principles for the design of natural product libraries. **Journal Natural Products**, v. 75, p. 72-81, 2011.
- DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, 2012.
- LANÇAS, F. M. **Extração em fase sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004. 96 p.
- LIPINSKI, C. A.; LOMBARDO, F.; DOMINY, B. W.; FEENEY, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 23, p. 3-25, 1997.
- LIPINSKI, C. A. Lead and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 1, n. 4, p. 337-341, 2004.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.
- PATEL, J. R.; TRIPATHI, P.; SHARMA, V.; CHAUHAN, N. S.; DIXIT, V. K. *Phyllanthus amarus*: ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: a review. **Journal Ethnopharmacology**, v. 138, p. 286-313, 2011.
- SECCO, R. S. Phyllanthaceae in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB24160>>. Acesso em: 05 jun. 2016.
- SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; MCMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BODESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer – drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.
- UNANDER, D. W.; WEBSTER, G. L.; BLUMBERG, B. S. Usage and bioassays in *Phyllanthus* (Euphorbiaceae): a compilation. III. The subgenera *Eriococcus*, *Conami*, *Gomphidium*, *Botryainthus*, *Xylophylla* and *Phyllanthodendron*, and a complete list of the species cited in the three-part series. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n. 2, p. 103-12, 1992.

Exemplares desta edição
podem ser adquiridos na:

Embrapa Agroindústria Tropical
Rua Dra. Sara Mesquita, 2270, Pici
60511-110, Fortaleza, CE
Fone: (85) 3391-7100
Fax: (85) 3391-7109 / 3391-7195
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

1ª edição
(2019): on-line



MINISTÉRIO DA
AGRICULTURA, PECUÁRIA
E ABASTECIMENTO



Comitê Local de Publicações
da Embrapa Agroindústria Tropical

Presidente

Gustavo Adolfo Saavedra Pinto

Secretária-executiva

Celli Rodrigues Muniz

Secretária-administrativa

Eveline de Castro Menezes

Membros

Marios Alves Bezerra, Ana Cristina Portugal

Pinto de Carvalho, Deborah dos Santos

Garruti, Dheyne Silva Melo,

Ana Iraídy Santa Brígida,

Eliana Sousa Ximenes

Supervisão editorial

Ana Elisa Galvão Sidrim

Revisão de texto

José Cesamildo Cruz Magalhães

Normalização bibliográfica

Rita de Cassia Costa Cid

Projeto gráfico da coleção

Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Editoração eletrônica

José Cesamildo Cruz Magalhães

Imagem da capa

Guilherme Julião Zocolo